

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Über den Mechanismus der renalen
Elimination des Chlortetracyclins und
seines demethylierten Derivates

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1964

vorgelegt von
Dieter H. W. Borgmann
aus Berlin

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

ÜBER DEN MECHANISMUS DER RENALEN
ELIMINATION DES CHLORTETRACYCLINS
UND SEINES DEMETHYLIERTEN DERIVATES

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter, H. W. Borgmann

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hugo Gasteiger

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Gerhard Senft

Korreferent: Professor Dr. med. Hans Herken



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 22. Sept. 1964

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	5
II. Methodik	7
1. Mikrofluorimetrische Bestimmung des Chlortetracyclins	7
2. Mikrofluorimetrische Bestimmung des Demethylchlortetracyclins	9
3. Apparatur zur Fluoreszenzmessung	12
4. Herstellung der Eichlösungen	12
5. Bestimmung der renalen Clearance von Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin bei konstanter Zufuhr der Antibiotika	13
6. Bestimmung der tubulären Sekretion im Stop-Flow-Experiment	17
7. Messung der renalen Ausscheidung der Antibiotika bei gleichzeitiger Bestimmung der Plasmakonzentration	20
8. Eiweißbindung der Antibiotika	23
9. Statistische Auswertung	24
III. Ergebnisse	25
1. Bestimmung der Chlortetracyclinclearance bei konstanter Plasmakonzentration des Antibiotikums	25
2. Bestimmung der Demethylchlortetracyclinclearance bei konstanter Plasmakonzentration des Antibiotikums	25
3. Nachweis der tubulären Sekretion im Stop-Flow-Experiment	27
4. Bestimmung der Antibiotikaclearance bei gleichzeitiger Gabe von Probenecid	31
5. Abfall der Plasmakonzentration nach einmaliger Injektion von 20 mg/kg CTC bzw. DMCT	34
6. Abfall der Plasmakonzentration und Clearance des Demethylchlortetracyclins nach einmaliger intravenöser Injektion von 20 mg/kg und kontinuierlicher Zufuhr von Probenecid	36

	<u>Seite</u>
7. Reduktion der Demethylchlortetracyclin-Clearance beim Menschen	39
8. Berechnung der "Verteilungsvolumina" von Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin	42
IV. Diskussion	45
V. Zusammenfassung	49
VI. Literaturverzeichnis	51

I. Einleitung

Chlortetracyclin ⁺) war das erste Antibiotikum der Tetracyclingruppe. Es wurde im Jahre 1948 von Duggar aus *Streptomyces aureofaciens* isoliert. Seine antibiotische Wirksamkeit wurde in zahlreichen bakteriologischen und klinischen Untersuchungen festgestellt (Gill, 1962; Goldberg, 1959; siehe dort weitere Literatur).

Eine Mutante dieses Strahlenpilzes bildet das 7-Chlor-6-demethyl-Tetracyclin ⁺), wie von Mc. Cormick, Sjolander, Hirsch, Jensen und Doerschuk (1957) mitgeteilt wurde. Die Aufklärung der chemischen Struktur ergab, daß sich das Demethylchlortetracyclin vom Chlortetracyclin lediglich durch das Fehlen einer Methylgruppe unterscheidet, die in Stellung 6 des Moleküls angeordnet ist (siehe Abbildung 1).

Ein gemeinsames Kennzeichen besteht in ihrem Ampholytcharakter und in ihrer Fähigkeit, mit Säuren oder Basen Salze zu bilden. In neutralen Lösungen liegen sie hauptsächlich als Zwitterionen vor. In Form eines sauren Salzes läßt ihre Struktur drei verschiedene Säuregruppen erkennen: Das Tricarbonyl-methansystem (A), das Ammoniumkation (B) und das phenolische Diketonsystem (C) (siehe Abbildung 1).

Trotz dieser geringen Unterschiede in der chemischen Struktur zeichnet sich das Demethylchlortetracyclin gegenüber dem Chlortetracyclin durch eine größere Stabilität und eine längere antibiotische Wirksamkeit aus. (Siehe Gill, 1962).

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Mechanismus

⁺) Chlortetracyclin = CTC
Demethylchlortetracyclin = DMCT

der renalen Elimination der beiden Antibiotika. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Verbindungen tubulär sezerniert werden und ob ihre von der Höhe der Plasmakonzentration abhängige Wirkung durch Hemmung der tubulären Sekretion verlängert werden kann.

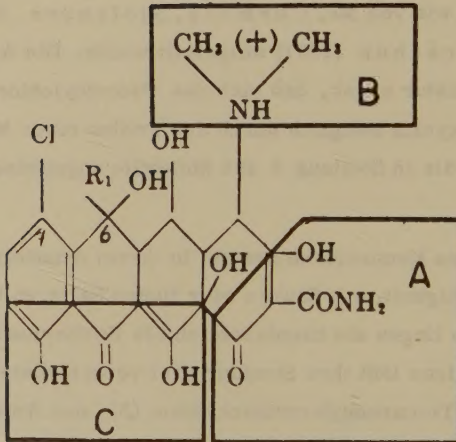


Abbildung 1

Chlortetracyclin:

$R_1 = CH_3$

Demethylchlortetracyclin: $R_1 = H$

II. Methodik

Die Konzentrationen der Antibiotika Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin im Plasma und im Urin wurden durch die Messung der Spektrofluoreszenz bestimmt.

Zur Analyse des Chlortetracyclins verwendeten wir das von Hajdu und Häussler (1962) angegebene Verfahren. Demethylchlortetracyclin wurde mit der von Kohn (1961) angegebenen Methode bestimmt.

Die Fluoreszenz der Tetracycline ist durch ein spezifisches Anregungs- und Fluoreszenzspektrum charakterisiert. Das Anregungsspektrum ist dabei mit dem Absorptionsspektrum identisch; die Fluoreszenz tritt bei höheren Wellenlängen auf (Udenfriend 1962).

1. Mikrofluorimetrische Bestimmung des Chlortetracyclins.

Diese von Hajdu und Häussler (1962) angegebene Methode wurde ursprünglich zur Bestimmung des Pyrrolidino-methyl-tetracyclins (Reverin[®]) entwickelt. Wir verwendeten sie zur Analyse der CTC-Konzentrationen im Plasma und im Urin.

Reagentien:

1. Butanol: mit 1 n NaOH und 1 n HCl gereinigt und mit Aqua dest. neutral gewaschen; anschließend bei 116 - 118°C überdestilliert,
2. Hexan: mit rauchender H₂SO₄ gewaschen und bei 69°C überdestilliert,
3. 0,1 n NaOH aus 1 n Titrisollösung (Merck),
4. 0,005 n H₂SO₄ aus 1 n Titrisollösung (Merck).

Arbeitsgang:

0,5 ml des verdünnten Urins bzw. 0,5 ml des verdünnten Plasmas wurden in ein mit einem Schliffstopfen versehenes 12,5 ml fassendes Zentrifugenglas pipettiert. Nach Zusatz von 0,5 ml 0,1 n NaOH und 5 ml gereinigtem Butanol wurde der Ansatz 15 Minuten durch Rotation geschüttelt und das durch Butanol gefällte Eiweiß abzentrifugiert. 3 ml des Überstandes (Butanol) wurden in ein zweites Zentrifugenglas mit Schliffstopfen

pipettiert, mit 2 ml 0,005 n H_2SO_4 und 2 ml Hexan versetzt und danach 15 Minuten geschüttelt. Nach Entfernen der organischen Phase wurde 1 ml des Rückstandes 1 ml 0,1 n NaOH hinzugefügt.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einem pH von > 9 und einer Wellenlänge von $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ unter Aktivierung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 350 \text{ m}\mu$. (Siehe Abbildung 2). Die Fluoreszenz hat ein Maximum bei $\text{pH} > 9$. Zur Erreichung dieser Werte verwendeten wir 0,1 n NaOH an Stelle der von Hajdu und Häussler (1962) angegebenen 0,01 normalen.

Das zur Bestimmung des Chlortetracyclins verwendete Verfahren ist zur Bestimmung des Demethylchlortetracyclins wenig geeignet, wie wir in Vorversuchen feststellten. Zur Analyse des Demethylchlortetracyclins verwendeten wir daher die von Kohn (1961) publizierte Methode.

Fluoreszenzspektrum Chlortetracyclin (CTC)
(Methode Hajdu-Häussler)

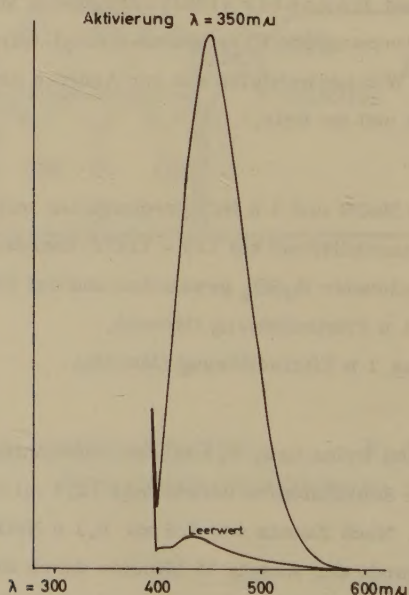


Abbildung 2

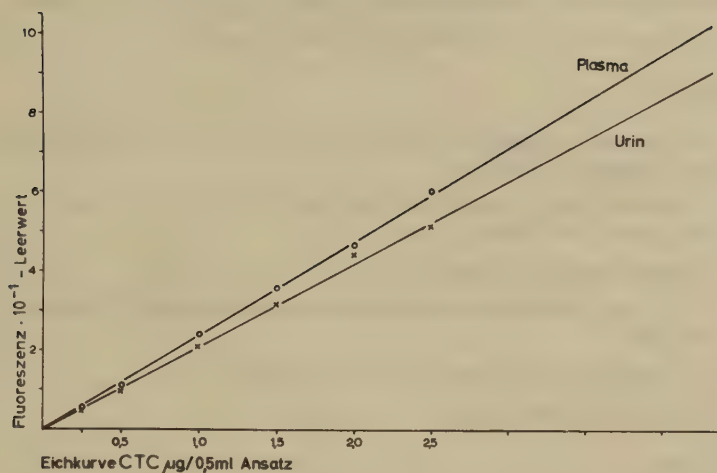
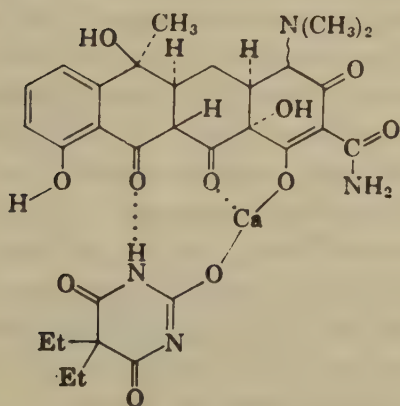


Abbildung 3

2. Mikrofluorimetrische Bestimmung des Demethylchlortetracyclins.



Mit der von Kohn (1961) angegebenen Methode ist es möglich, alle Tetracycline mit Ausnahme des Oxytetracyclins zu bestimmen. Hierbei werden die Derivate des Naphthazens aus den biologischen Medien extrahiert und in einen Tetracyclin-Calcium-Barbiturat-Komplex übergeführt, für den von Kohn (1961) die folgende Strukturformel vorgeschlagen wurde (s. Abbildung 4).

Abbildung 4: Formel für den Tetracyclin-Ca-Barbituratkomplex (Kohn, 1961).
Et = Äthyl.

Der Komplex hat ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 550 \text{ m}\mu$, wenn er bei $\lambda = 390 \text{ m}\mu$ aktiviert wird. (Siehe Abbildung 5).

Reagentien:

1. 1,9 n Trichloressigsäure (Mol. Gew. 163,4) mit 0,004 M KH_2PO_4 (Mol. Gew. 136,09),
2. 0,06 M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Mol. Gew. 331,23) mit 2,0 M Na-Azetat (Mol. Gew. $136,086 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$),
3. 0,32 M KJO_3 (Mol. Gew. 214,01),
4. 0,9 M Na-Barbital (Diäthylbarbitursaures-Natrium) (Mol. Gew. 206,18),
5. 0,1 M CaCl_2 (Mol. Gew. $147,022 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$),
6. Destilliertes Äthylazetat.

Arbeitsgang:

Plasma und Urin wurden mit destilliertem Wasser verdünnt. Hiervon wurden 0,5 ml vorgelegt und mit Aqua quart. dest. auf 4 ml aufgefüllt. Das Eiweiß wurde mit 1 ml 1,9 n Trichloressigsäure gefällt und abzentrifugiert. Da bereits sehr geringe Mengen Eiweiß die Analyse störten, war es notwendig, auch den Rattenurin mit Trichloressigsäure zu behandeln. 2 ml einer 0,06 M PbNO_3 und 2,0 M Na-Azetatlösung wurden zu 4 ml des Überstandes in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Zur Vervollständigung der Präzipitation wurden 15 Minuten bis zum Abzentrifugieren gewartet. Wiederum wurden 4 ml abpipettiert, in einem Zentrifugenröhrchen mit 1 ml 0,32 M KJO_3 -Lösung versetzt und nach 30 - 60 Minuten abzentrifugiert. 4 ml des Überstandes wurden in ein mit einem Schliffstopfen versehenes 22,5 ml fassendes Zentrifugenglas pipettiert, in dem sich 3 ml 0,9 M Na-Barbital und 3 ml 0,1 M CaCl_2 befanden. Anschließend wurden noch 3 ml Äthylazetat hinzugefügt und der Ansatz 15 Minuten durch Rotation geschüttelt. Das zunächst ausfallende Barbiturat löst sich beim Schütteln in der Äthylazetatphase. Hierin wurde die Fluoreszenz des Tetracyclin-Calcium-Barbital-Komplexes gemessen.

Fluoreszenzspektrum (Methode Kohn)
DMCT- Ca^{++} -Barbital-Komplex

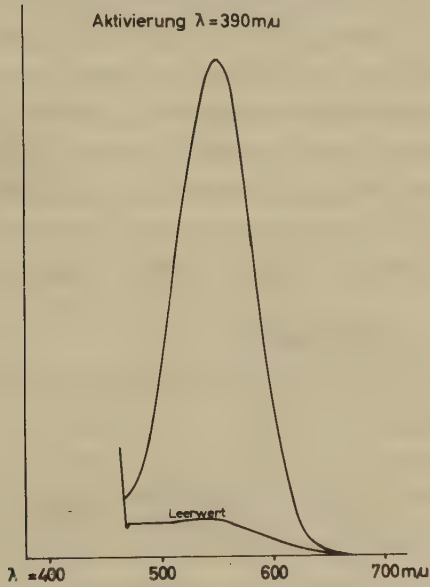


Abbildung 5

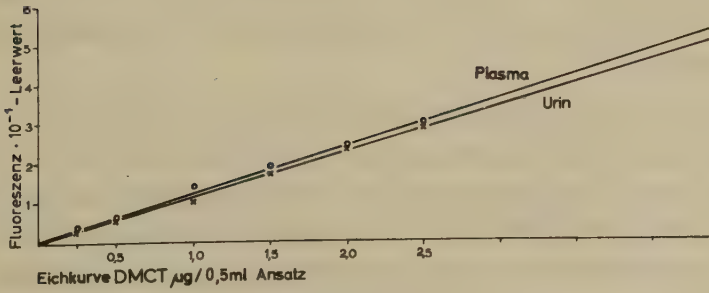


Abbildung 6

3. Apparatur zur Fluoreszenzmessung.

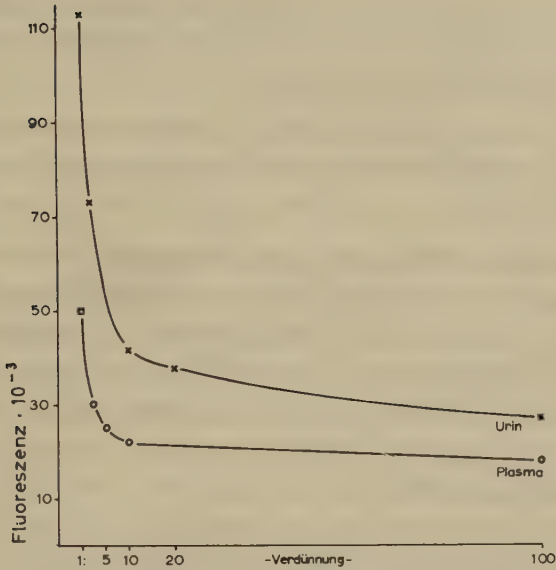
Wir verwendeten hierfür ein Spektrophotofluorimeter der Firma Aminco-Bowman (Cat. No. 4-8106), das mit einer Xenon-Lichtbogenlampe, einem Recht-Winkel-Detektor und einem Photomultiplier-Microphotometer ausgestattet war. Die Spaltkombination betrug 1/16 Inch, ($\approx 1,59$ mm). Die Demethylchlortetracyclinkonzentrationen wurden in einer Quarzküvette (4-8113) mit 0,5 ml Fassungsvermögen (Durchmesser 4 mm, Höhe 40 mm) gemessen. Für die Chlortetracyclinanalysen verwendeten wir eine Quarzküvette (4-8112) mit 1,4 ml Kapazität (Durchmesser 7 mm, Höhe 40 mm).

4. Herstellung der Eichlösungen.

Alle Reagentien, die wir zur Durchführung der in den Abschnitten 1 und 2 beschriebenen Bestimmungen verwendeten, wurden mit vierfach destilliertem Wasser angesetzt. Zur Verdünnung von Plasma und Urin benutzten wir destilliertes Wasser. Auf diese Weise gelang es, störende Leerwertfluoreszenzen weitgehend auszuschalten.

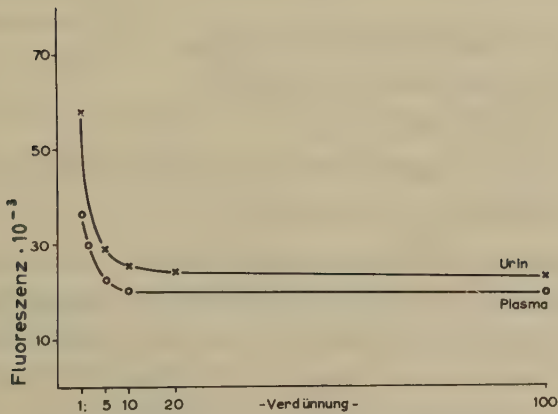
Zur Anfertigung der Eichlösungen verwendeten wir die Natriumsalze der Tetracycline, die aus den Hydrochloriden der Handelspräparate unter Zusatz von 1 n NaOH hergestellt wurden. Anschließend wurde die Lösung sofort mit destilliertem Wasser verdünnt, mit 1 n HCl zurücktitriert und auf einen pH = 7 eingestellt. Es wurde darauf geachtet, daß die Lösungen unmittelbar nach ihrer Herstellung in den Analysengang genommen wurden.

Zur Bestimmung der Leerwertfluoreszenz wurde Plasma und Urin von unbehandelten Tieren gewonnen und mit destilliertem Wasser verdünnt. Der Plasma- und Uringehalt wurde dabei so eingestellt, daß die Lösungen die gleichen Volumenanteile der biologischen Flüssigkeiten enthielten, die auch bei der Messung der Antibiotikakonzentrationen auftraten. Bei den einzelnen Versuchen mußten nämlich, je nach der zu erwartenden Antibiotikakonzentration, verschiedene Plasma- bzw. Urinverdünnungen hergestellt werden.



Abhängigkeit der Leerwertfluoreszenz vom Urin- bzw. Plasmagehalt der Analyse, CTC - Bestimmung

Abbildung 7



Abhängigkeit der Leerwertfluoreszenz vom Urin- bzw. Plasmagehalt der Analyse, DMCT - Bestimmung

Abbildung 8

Die Messung der Leerwertfluoreszenz ergab eine deutliche Abhängigkeit vom Urin- bzw. Plasmagehalt der Proben. (Siehe Abbildung 7 CTC-Bestimmung; Abbildung 8 DMCT-Bestimmung).

In einem Verdünnungsbereich von 1 : 10 bis 1 : 100 waren die Leerwerte fast gleich groß. Ein höherer Plasma- bzw. Uringehalt führte dagegen zu einem steilen Anstieg der Leerwertfluoreszenz.

Die mit Hilfe dieses Auswertungsverfahrens ermittelten Leerwerte wurden von der Fluoreszenz subtrahiert, die bei der Messung aufsteigender CTC- bzw. DMCT-Konzentrationen ermittelt wurde. Auch die Eichlösungen waren nämlich mit einem bestimmten Plasma- bzw. Uringehalt eingestellt worden. Die bei der Messung der Antibiotika im Plasma und im Urin behandelte Tiere gegebenen Bedingungen waren somit die gleichen, die bei der Aufstellung der Eichreihe vorlagen.

Zwischen der Antibiotikakonzentration ($0,25-10 \mu\text{g/ml}$ Plasma bzw. Urin) und der Fluoreszenzintensität bestand eine lineare Beziehung (Siehe Abbildung 3 CTC-Bestimmung; Abbildung 6 DMCT-Bestimmung). Nach Zusatz von Plasma bzw. Urin ergab sich ein geringer Unterschied, der jedoch im Bereich der abgelesenen Werte kaum ins Gewicht fiel.

5. Bestimmung der renalen Clearance von Chlor- tetracyclin und Demethylchlortetracyclin bei konstanter Zufuhr der Antibiotika.

Die Versuche wurden an männlichen Ratten (Sprague-Dawley) durchgeführt. Ihr Durchschnittsgewicht betrug 200 g.

Zur Erzielung konstanter Bedingungen verwendeten wir eine Infusionsmethode (Herken, Senft, Wilutzky, 1956), deren Modifikation in der Arbeit von Herken, Senft, Schwarz und Mercker (1963) angegeben ist.

Die Tiere sitzen dabei in Plexiglaskäfigen, die eine getrennte Sammlung von Harn und Stuhl gewährleisten. Vor Beginn des Experimentes wurde

den Tieren ein mit einer Injektionsnadel versehener Katheter in die Schwanzvene eingeführt. Hierdurch erhielten sie eine einmalige Injektion von 2,5 mg CTC bzw. DMCT, die in 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst waren. Anschließend wurden jeweils 2,5 mg der Antibiotika mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung/Tier und Stunde durch kontinuierliche Infusion zugeführt.

90 Minuten nach Versuchsbeginn wurden jeweils 7,5 ml/kg einer 2%igen wäßrigen Inulinlösung subcutan und intraperitoneal injiziert. 15 Minuten später begann die Clearanceperiode, nachdem zuvor die Harnblasen der Tiere durch Druck auf die Schwanzwurzel reflektorisch entleert wurden. Am Ende der Clearanceperiode (Dauer 15 Minuten) wurden die Harnröhren der Ratten mit einer Kocherklemme abgeklemmt, die Tiere dekapitiert und die Harnblasen präpariert und herausgenommen. Der Blaseninhalt wurde mit dem während der Clearanceperiode ausgeschiedenen Harn vereinigt und auf 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Das beim Dekapitieren gewonnene Blut fingen wir in Zentrifugenröhrchen auf, die zuvor mit einem Siliconfilm versehen und mit einer Heparinlösung ⁺⁾ ausgesprüht worden waren. Das durch Zentrifugieren gewonnene Plasma wurde mit destilliertem Wasser 1 : 5 verdünnt. Jeweils 0,5 ml des verdünnten Plasmas verwendeten wir zur Bestimmung der CTC- bzw. der DMCT-Konzentrationen.

a. Bestimmung der Inulinkonzentration im Plasma und im Urin.

Zur quantitativen Inulinbestimmung diente uns die von Führ, Kaczmarczyk und Krüttgen (1955) angegebene spektrophotometrische Methode.

Sie beruht auf dem Prinzip, daß Hexosen und hexosehaltige Polysaccharide mit Anthron einen blaugrün gefärbten Komplex bilden. Eine Unterscheidung von Glucose und Inulin ist aber möglich, da die Intensität des mit Inulin gebildeten Farbkomplexes 50 mal stärker ist, wenn man die Reaktion bei 55° auf 10 Minuten begrenzt.

⁺⁾ Ich danke der Firma Hoffmann La Roche für die Überlassung von Na⁺ und K⁺ freien Calcium-Heparinat.

Reagentien:

1. 4%ige Trichloressigsäure,
2. Anthronreagenz: aus 200 mg Anthron und 100 ml H_2SO_4 ,
die aus 2,5 Teilen H_2SO_4 ($d=1,84$) und
1 Teil Aqua bidest. besteht.

Arbeitsgang:

0,2 ml Plasma wurden mit 1,8 ml 4%iger Trichloressigsäure versetzt und abzentrifugiert. 5 ml Anthronreagenz überschichteten wir anschließend mit 0,5 ml dieses Überstandes bzw. 0,5 ml des 1 : 10 verdünnten Clearance-Urins. Diese Ansätze wurden geschüttelt, mit einem Gummistopfen verschlossen und für 10 Minuten (Stoppuhr) in ein Wasserbad von 55°C gestellt.

Die Bestimmung erfolgte anschließend mit einem Beckman Spektrophotometer DB bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630 \text{ m}\mu$ gegen Aqua dest. Gemessen wurde in viereckigen, 4 ml fassenden Quarzküvetten. Die Schichtdicke betrug 1 mm. Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden Inulinkonzentrationen von 2,5, 5, 10 und 20 mg% verwendet. Leerwerte wurden in gleicher Weise aufgearbeitet. In dem angegebenen Meßbereich verhielten sich die Extinktionen und Inulinkonzentrationen proportional.

b. Berechnung der renalen Clearance.

Die glomeruläre Filtration wurde aus den Inulinkonzentrationen im Plasma und im Urin nach der von Mayrs und Watt (1922) angegebenen Formel $\frac{U \times V}{P}$ berechnet. Die gleiche Formel verwendeten wir zur Bestimmung der renalen Clearance der Antibiotika. Die Werte wurden in ml/kg und Minute angegeben.

Der aus der Clearance der Antibiotika und der Inulinclearance gebildete Quotient dient als Maß für die Rückdiffusion der Pharmaka. Eine tubuläre Rückgewinnung bzw. Rückdiffusion liegt vor, wenn der Quotient kleiner als 1 ist.

6. Bestimmung der tubulären Sekretion im Stop-Flow-Experiment.

Zur Prüfung der Frage, ob die Tetracycline nicht nur glomerulär filtriert und resorbiert, sondern auch tubulär sezerniert werden, verwendeten wir die von Malvin, Sullivan und Wilde (1957) und Malvin, Wilde und Sullivan (1958) ausgearbeitete Stop-Flow-Methode. Das Prinzip der Methode besteht in folgendem:

Bei Tieren wird ein Polyäthylenkatheter durch den freigelegten Ureter soweit wie möglich in das Nierenbecken hinaufgeschoben. Danach wird eine osmotische Diurese durch intravenöse Dauerinfusion einer Manitolösung eingeleitet, der zur Prüfung der tubulären Funktionen Inulin, Para-Aminohippursäure und NaCl hinzugefügt werden. Wenn der Harnfluß einen konstanten Wert erreicht hat, wird der Ureter für eine bestimmte Dauer abgeklemmt. Dies führt zu einem Druckanstieg in dem tubulären System, so daß der effektive Filtrationsdruck reduziert oder aufgehoben wird. Auf die in dem tubulären System stehende "Harnsäule" wirken nun die Funktionen der Tubuluszellen ein. Sie prägen sich stärker aus als bei normalem Harnfluß, weil die Zeit verlängert ist, in der der Harn mit den Tubuluszellen in Kontakt bleibt. Anschließend wird der Ureterenkatheter wieder geöffnet und der ausfließende Urin fraktioniert aufgefangen.

Zur Durchführung dieses Versuches wurden männliche Ratten durch intraperitoneale Injektion von Hexobarbital narkotisiert und die retroperitoneal liegenden Ureteren von der Bauchhöhle aus präpariert. In jeden Ureter führten wir einen Polyäthylenkatheter (PE 10 der Firma Clay-Adams, Innendurchmesser: 0,28 mm, Außenumfang: 0,61 mm) ein und fixierten ihn mit Zwirnschlingen. Anschließend erhielten die Tiere 20 mg/kg CTC bzw. DMCT durch einmalige intravenöse Injektion und durch intravenöse Dauerinfusion (0,4 ml/Minute) eine Lösung, die folgende Zusammensetzung hatte:

9,000 g NaCl	200,0 g Mannit
0,894 g KCl	20,0 g Inulin
0,250 g CaCl ₂	1,0 g PAH
0,200 g NaHCO ₃	Aqua dest. ad 1000

Vor der Stop-Flow-Periode wurden 2 Fraktionen als "Free-Flow-Proben" gesammelt, nach der Okklusion 26 Fraktionen zu je 2 Tropfen in 100 x 12 mm Reagenzröhrchen aufgefangen. Das Blut der Tiere wurde nach Dekapitieren in einem heparinisierten Zentrifugenröhrchen gesammelt, abzentrifugiert, das Plasma abpipettiert und mit destilliertem Wasser 1 : 100 verdünnt. Gleiche Verdünnungen stellten wir von den Urinfraktionen her. In diesen Proben wurden die Natrium-, Inulin-, PAH- und Antibiotikakonzentrationen bestimmt.

a. Bestimmung der Natriumkonzentration im Plasma und im Urin.

Die Natriumkonzentrationen der verschiedenen Fraktionen wurden zur Charakterisierung des distalen Resorptionsmaximums bestimmt. Zur Messung benutzten wir ein Beckmann Spektrophotometer Modell DU mit Multiplier und Flammenphotometerzusatz. Die Eichlösungen hatten einen Natriumgehalt von 0,5 bis 5,0 $\mu\text{val/ml}$.

b. Bestimmung der PAH-Konzentration im Plasma und im Urin.

Die Analyse der Para-Aminohippursäure dient zur Charakterisierung der proximalen Tubulusfunktionen. Zu ihrer Bestimmung verwendeten wir ein von Friedmann, Polley und Friedmann (1947) angegebenes Verfahren.

Reagentien:

4 % Trichloressigsäure,

0,5 % Ammonsulfat,

0,1 % NaNO_2 ,

0,1 % N- (1-naphthyl) äthylendiamindihydrochlorid.

Die Lösungen, außer der Trichloressigsäure, wurden für jede Bestimmung neu angesetzt. Die Bestimmung der PAH beruht auf der Messung eines roten Farbstoffes, der nach Diazotierung der p-Aminogruppe und Kopplung mit N- (1-naphthyl) äthylendiamin entsteht.

Arbeitsgang:

0,5 ml des 1 : 100 verdünnten Urins bzw. Plasmas wurden mit 2,5 ml 4%iger Trichloressigsäure versetzt. Das ausgefallene Eiweiß wurde abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden in ein Reagenzglas pipettiert. Dann wurden 0,3 ml NaNO_2 , 0,3 ml Ammonsulfat und 1,5 ml N-(1-naphthyl)äthylendiamindihydrochlorid im Abstand von 3 Minuten unter Schütteln den Proben zugesetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurde der gebildete Farbstoff in einem Beckman Spektrophotometer DB bei einer Wellenlänge von $\lambda = 545 \text{ m}\mu$ gegen Aqua dest. gemessen. Zu jeder Messung stellten wir eine Eichreihe her, die 0,5 bis 1,5 mg% PAH in 2%iger Na_2SO_4 Lösung enthielt. Die gemessenen Werte wurden nach Abzug des Leerwertes aus der linearen Eichkurve abgelesen.

c. Bestimmung der Inulinkonzentration im Plasma und im Urin.

Sie erfolgte entsprechend der in Kapitel 5 a beschriebenen Methode.

d. Bestimmung der CTC- und DMCT-Konzentrationen im Plasma und im Urin.

Die Antibiotika wurden mit den in den Kapiteln 1 und 2 angegebenen Verfahren gemessen.

e. Auswertung der Meßergebnisse.

Die in den einzelnen Harnfraktionen gemessenen Inulinkonzentrationen wurden durch die Plasmakonzentration dividiert. Der Quotient ist ein Maß für die Resorption des Wassers.

Die Natrium-, PAH- und Antibiotikakonzentrationen der Stop-Flow-Fractionen wurden ebenfalls durch die jeweilige Plasmakonzentration geteilt; die erhaltenen Werte durch den Quotienten $\frac{U}{P}$ (Inulin) dividiert.

Dieser Quotient ist größer als 1, wenn die Verbindungen tubulär sezerniert werden. Unter 1 liegende Werte sprechen für eine tubuläre Resorption bzw. Rückdiffusion.

7. Messung der renalen Ausscheidung der Antibiotika bei gleichzeitiger Bestimmung der Plasmakonzentrationen.

Für diese Versuche verwendeten wir die gleiche Infusionstechnik, die auch bei der Messung der Clearance benutzt wurde. (Siehe Kapitel 5).

An Stelle einer isotonischen Kochsalzlösung erhielten die Tiere eine 0,2%ige NaCl-Lösung, die durch Zusatz von 4,3 g Glucose äquilibriert war. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/Stunde. 2 Stunden nach Infusionsbeginn wurden 20 mg/kg CTC bzw. DMCT durch den in der Schwanzvene liegenden Katheter injiziert. Die Plasmakonzentration der Antibiotika wurde nach 1, 10 und 30 Minuten, 1, 2, 4, 6, 8 und 24-Stunden gemessen. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, die mit einem Siliconfilm versehen und mit Heparin ausgesprüht worden waren. Das durch Zentrifugieren gewonnene Plasma wurde zur Tetracyclinbestimmung 1 : 5 verdünnt.

Der zwischen den einzelnen Blutentnahmen ausgeschiedene Harn wurde gesammelt und nach entsprechender Verdünnung (bis zur vierten Stunde 1 : 20, danach 1 : 10) zur Bestimmung der Antibiotika aufgearbeitet.

a. Technik der Blutentnahme.

Die wiederholte Entnahme bereitet bei kleineren Laboratoriumstieren relativ große Schwierigkeiten. Das von Nöller (1958) angegebene Verfahren, bei dem Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus gewonnen wird, war für unsere Versuche nicht geeignet, da der Eingriff offensichtlich eine vorübergehende Kreislaufstörung bewirkt, die eine Beeinträchtigung der Diurese zur Folge hat.

Eine andere Möglichkeit würde darin bestehen, Tiere nach bestimmten Zeitabschnitten durch Dekapitierung zu töten und das dabei gewonnene Blut zur Analyse zu verwenden. Auch dieses Verfahren ist praktisch unbrauchbar, weil der Abfall der Plasmakonzentration nicht individuell gemessen wird und die große Streuung eine statistische Auswertung der Versuchsergebnisse nicht gestattet.

Zur Vermeidung dieser Fehlerquellen entwickelten wir eine Methode, die eine wiederholte Blutentnahme am selben Tier ermöglicht, wobei die entnommenen Blutmengen durch Infusion von Frischblut getöteter Ratten ersetzt werden.

Hierzu wurden männliche Ratten mit Hexobarbital narkotisiert. Nach Präparation der linken Carotis wurde diese cranial doppelt unterbunden; caudal wurde eine Arterienklemme angelegt. Anschließend eröffneten wir das Gefäß mit einer angeschliffenen Kanüle und führten einen angeschrägten Polyäthylenkatheter (PE 10 der Firma Clay-Adams, Innendurchmesser: 0,28 mm, Außendurchm.: 0,61 mm) ein, der mit einer 0,2%igen Heparinlösung gefüllt und an seinem distalen Ende durch einen Mandrin verschlossen war. Danach legten wir zwei Ligaturen um den in der Carotis liegenden Katheter, die jedoch erst dann fest angezogen wurden, nachdem die Arterienklemme entfernt und der Katheter ca. 2 cm in die Aorta vorgeschoben war. Sein distales Ende wurde mit Hilfe einer Punktionskanüle unter dem Fell zum Nacken des Tieres geleitet und dort fixiert. Die Halswunde wurde mit Michel-Klammern verschlossen.

Zu Beginn des Infusionsversuches führten wir den Katheter durch eine Öffnung des Plexiglaskäfigs nach außen und verbanden ihn mit einem Hahn, dessen Konstruktion auf der Abbildung 9 wiedergegeben ist. Nach Öffnung des Hahnes und Verwerfen der unter Druck austretenden Heparinlösung können definierte Blutvolumina in einer Tuberkulinspritze aufgenommen werden. Anschließend werden gleiche Blutmengen, die von einem Spendertier gewonnen wurden, reinfundiert und das System erneut mit der Heparinlösung gefüllt. Zur Verminderung der Blutgerinnung erhielten die Spendertiere 1 ml einer 0,2 %igen Heparinlösung durch intravenöse Injektion.

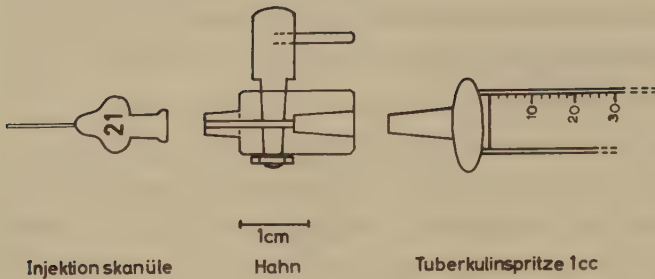


Abbildung 9

b. Auswertung der Meßergebnisse.

Die bei der Bestimmung der Plasmakonzentration der Antibiotika gemessenen Werte wurden in logarithmischem Maßstab auf der Ordinate (y) gegenüber der Zeit aufgetragen, die in dekadischem Maßstab auf der Abszisse (x) angegeben war. Dabei ergeben sich zwei Kurvenverläufe. Der erste umfaßt den Zeitabschnitt, in dem sich die Konzentration der Antibiotika im Blut mit der in den Geweben ins Gleichgewicht setzt. Der zweite Verlauf gibt den Abfall der Plasmakonzentration nach Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes wieder. (Dost 1953). Für die an zweiter Stelle genannten Werte wurde eine Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Summe der Fehlerquadrate durchgeführt (Küster und Thiel 1923). Die Abhängigkeit der Plasmakonzentration (y) von der Zeit nach Injektion des Antibiotikums (x) ist durch die Gleichung $y = a + bx + cx^2$ charakterisiert.

Aus dem errechneten Verlauf bestimmten wir die Eliminationskonstante

$$K_2 = \frac{\ln y_1 - \ln y_2}{t_2 - t_1} .$$

y_1 und y_2 sind dabei die den Abfall begrenzenden Konzentrationen;
 t_2 und t_1 die dazugehörigen Zeitabschnitte.

Die biologische Halbwertszeit wurde nach der Formel

$$t/2 = \frac{\ln 2}{K_2} \quad \text{ermittelt.}$$

Zur Aufstellung der renalen Antibiotikaclearance verwendeten wir die mittlere Plasmakonzentration.

In diesen Versuchen wurde auch das "Verteilungsvolumen" bestimmt und in der Dimension ml in % des Tiergewichtes angegeben. Es ergibt sich aus der Formel:

$$\frac{\text{Injizierte Dosis in } \mu\text{g} - \text{im Harn ausgesch. Menge in } \mu\text{g}}{\text{Plasmakonzentration des Antibiotikums in } \mu\text{g/ml}}$$

Das jeweilige Körpergewicht der Tiere wurde unter Berücksichtigung des Anfangsgewichtes, der infundierten Flüssigkeitsmenge, der Harnausscheidung und den extrarenalen Verlusten (0,46 g pro Tier und Stunde) berechnet.

8. Eiweißbindung der Antibiotika.

Bei Dialyseversuchen (Plasma gegen Phosphatpuffer) stellten wir fest, daß im Bereich der in unseren Experimenten auftretenden Plasmakonzentrationen etwa 10 % der Antibiotika an Eiweiß gebunden waren. Zwischen dem Chlortetracyclin und dem Demethylchlortetracyclin bestanden keine Unterschiede. Gleichlautende Resultate wurden bereits von Gill (1962) sowie von Scholtan und Schmid (1963) und Scholtan (1963) mitgeteilt. Die Eiweißbindung kann daher nicht für die verschieden große Elimination der beiden Antibiotika verantwortlich sein und wurde daher bei der Auswertung der Versuche nicht berücksichtigt.

9. Statistische Auswertung.

Der Streuungsbereich wurde aus der Formel

$$\sigma = \frac{\sum (x^2) - m \cdot \sum x}{n - 1}$$

der mittlere Fehler " ϵ " aus der Gleichung $\epsilon^2 = \frac{\sigma^2}{n}$ berechnet,

die Wahrscheinlichkeit "p" nach dem von P ä t a u (1943) angegebenen Verfahren bestimmt.

Auf den Abbildungen und Tabellen haben wir die Mittelwerte "m", sowie den mittleren Fehler " ϵ " eingetragen.

III. Ergebnisse

1. Bestimmung der Chlortetracyclin-Clearance bei konstanter Plasmakonzentration des Antibiotikums.

Männliche Ratten erhielten zu Beginn des Versuches 2,5 mg CTC durch eine intravenöse Injektion. Die Dosis war in 5 ml der Infusionsflüssigkeit (0,9 % NaCl) enthalten. Um eine während der Clearanceperiode konstante Konzentration des Antibiotikums im Plasma zu erreichen, wurden den Tieren anschließend 2,5 mg/Std. in dem gleichen Lösungsvolumen kontinuierlich zugeführt. Die Clearance des Inulins und des Tetracyclins wurde zwischen der 105. und der 120. Minute bestimmt.

Die glomeruläre Filtration betrug während dieser Zeit 8,1 ml/kg und Minute, die Plasmakonzentration 5,7 µg CTC/ml. 41,4 µg CTC/kg und Minute wurden filtriert. Hiervon wurden 30,5 µg/kg und Minute mit dem Harn ausgeschieden. Das entspricht einem zurückdiffundierten Anteil von 34 %.

Das mit dem Harn ausgeschiedene Antibiotikum war in 5,31 ml des Plasmas enthalten. Dieser Wert entspricht der Chlortetracyclin-Clearance. Sie ist kleiner als die Inulin-Clearance.

Aus beiden Clearancewerten errechnet sich eine Verhältniszahl von 0,66. Dieser unter 1 liegende Wert zeigt, daß 2/3 des ultrafiltrierten Antibiotikums mit dem Harn eliminiert werden, 1/3 der renalen Ausscheidung durch Rückdiffusion entzogen wird. (Siehe Tabelle 1).

2. Bestimmung der Demethylchlortetracyclin-Clearance bei konstanter Plasmakonzentration des Antibiotikums.

Mit der gleichen Versuchsanordnung wurde die Demethylchlortetracyclin-Clearance gemessen. Auch hierbei erhielten die Tiere 2,5 mg DMCT zu Beginn des Versuches als einmalige Injektion und 2,5 mg DMCT/Tier und Stunde kontinuierlich zugeführt.

Die glomeruläre Filtration wurde mit 8,9 ml/kg und Minute bestimmt. Sie war damit nur geringfügig höher, als in den zur Ermittlung der Chlortetracyclin-Clearance durchgeführten Versuchen. Die Plasmakonzentration des demethylierten Antibiotikums war unter diesen Bedingungen aber mehr als dreimal so hoch wie die des Chlortetracyclins. Infolgedessen erhöhte sich auch die Menge des filtrierte Antibiotikums um den entsprechenden Betrag. Mit dem Harn wurde aber noch nicht einmal die doppelte Menge ausgeschieden. Die Demethylchlortetracyclin-Clearance betrug damit nur 2,9 ml/kg und Minute. Der aus der Inulin- und der DMCT-Clearance gebildete Quotient zeigt mit einem Wert von 0,33, daß 67 % der filtrierte Antibiotikamenge zurückdiffundiert sind. Beim Chlortetracyclin waren es nur 34 %. Die Demethylierung des Tetracyclins führt somit zu einer Herabsetzung der renalen Clearance von 5,3 auf 2,9 ml/kg und Minute. Das entspricht einer Reduktion um 45 %. Die Unterschiede sind mit einem "p" von $< 0,0002$ statistisch gesichert. (Siehe Tabelle 1).

	Konzentration im Plasma P	Ausscheidung im Urin U · V	$\frac{U \cdot V}{P_j}$	$\frac{U \cdot V}{P}$	$\frac{U \cdot V}{P}$ $\frac{U_j \cdot V}{P_j}$
	µg/ml	µg/kg·Min	ml/kg·Min	ml / kg · Min	
CTC n = 10	5,74 ± 0,472	30,48 ± 3,085	8,09 ± 0,295	5,31 ± 0,155	0,66 ± 0,035
DMCT n = 10	19,49 ± 1,791	57,47 ± 13,410	8,88 ± 0,220	2,95 ± 0,123	0,33 ± 0,022
P	< 0,0002			< 0,0002	< 0,0002

Erniedrigung der renalen Antibiotika - Clearance durch Demethylierung des CTC.

Tabelle 1

Aus den Experimenten dieser beiden Versuchsreihen lassen sich zwei Aussagen ableiten:

1. Die im Vergleich zum Chlortetracyclin verlängerte Wirkungsdauer des Demethylchlortetracyclins kann durch die verminderte renale Clearance des demethylierten Produktes erklärt werden. Die Clearance wird herabgesetzt, weil der durch Rückdiffusion der Harnelimination entzogene Anteil beim Demethylchlortetracyclin größer ist.

2. An dem Mechanismus der renalen Ausscheidung der beiden Antibiotika sind die glomeruläre Filtration und Rückdiffusion beteiligt. Da die Clearancequotienten bei beiden Verbindungen unter 1 liegen, sieht es so aus, als ob die Pharmaka nicht zusätzlich tubulär sezerniert werden.

Diese Aussage ist uns aber nicht beweiskräftig, da wir in diesen Versuchen nur eine Gesamtbilanz erfassen und die tubuläre Sekretion durch eine stärkere anschließende Rückdiffusion verdeckt werden könnte. Zur Klärung der Frage, ob die beiden Antibiotika zusätzlich tubulär sezerniert werden, haben wir Stop-Flow-Untersuchungen an der Ratte durchgeführt.

3. Nachweis der tubulären Sekretion im Stop-Flow-Experiment.

a. Versuche mit Chlortetracyclin.

Der aus der Chlortetracyclin-Clearance und der Inulin-Clearance gebildete Quotient nimmt einen die Zahl 1 überschreitenden Wert an, wenn das Antibiotikum tubulär sezerniert wird. Hierfür konnten wir bei der Auswertung des Stop-Flow-Diagramms keinen Anhalt finden. (Siehe Abbildung 10).

Stop - Flow - Diagramm CTC

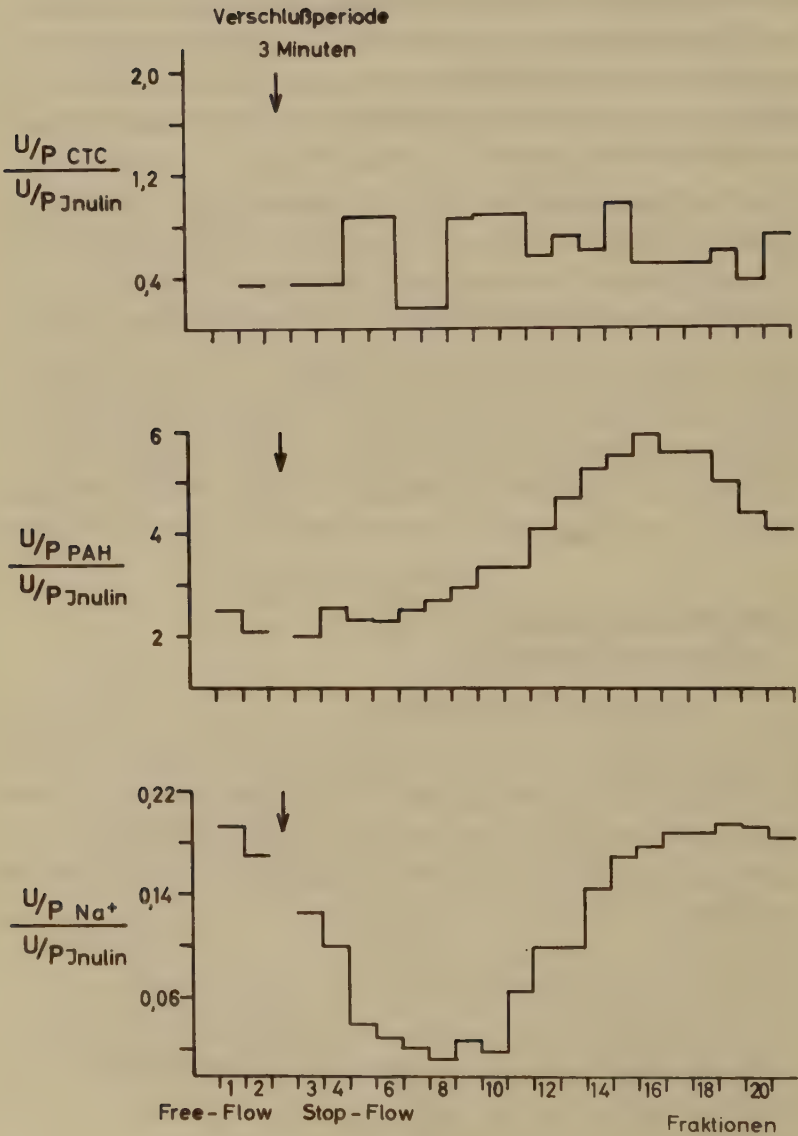


Abbildung 10

Stop-Flow - Diagramm DMCT

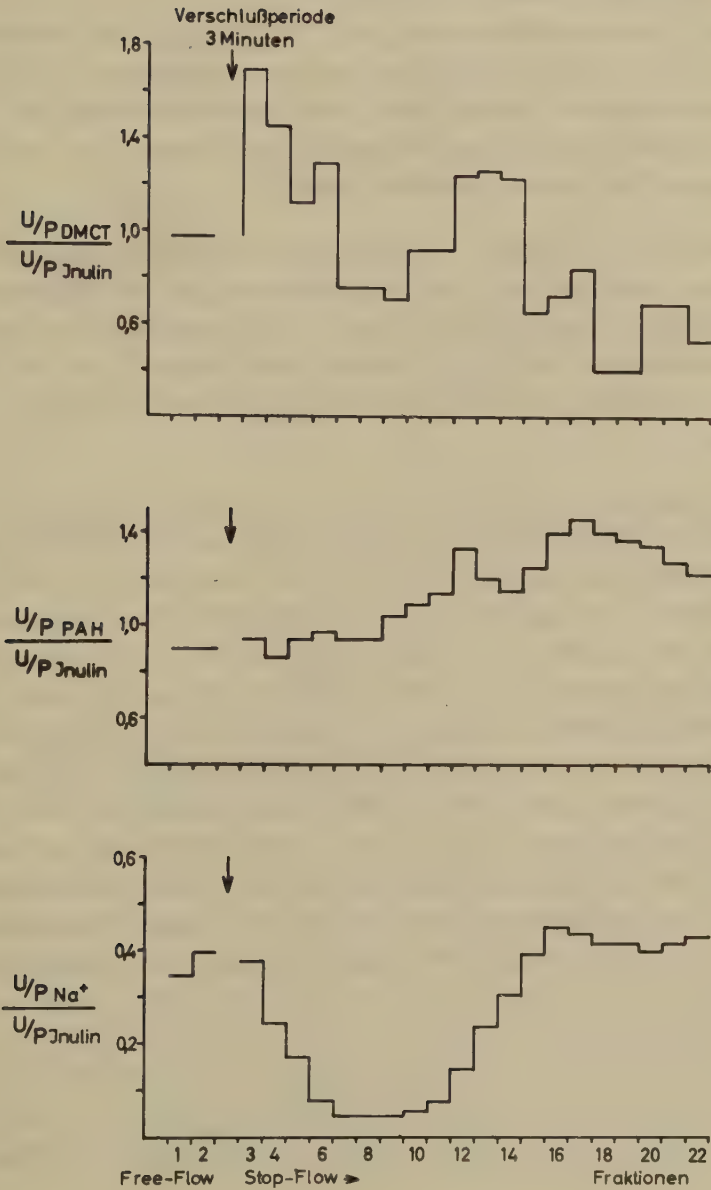


Abbildung 11

b. Versuche mit Demethylchlortetracyclin.

Über 1 liegende Clearancequotienten, die für eine tubuläre Sekretion des Antibiotikums sprechen, finden sich in einem Bereich, der mit dem Maximum der PAH-Sekretion annähernd übereinstimmt. Der in den distalen Abschnitten zu beobachtende Anstieg kann auf die pH-Veränderung des Harns zurückgeführt werden.

Hieraus läßt sich folgern, daß neben der Rückdiffusion und der glomerulären Filtration auch eine tubuläre Sekretion an dem Mechanismus der renalen Ausscheidung des Demethylchlortetracyclins beteiligt ist. Diese Aussage wird noch durch einen Befund gestützt, den wir bei der Berechnung der PAH-/Inulin-Clearancequotienten erhalten haben.

Die Untersuchungen von Mudge (1958), Sperber (1959) und Braun (1960) haben gezeigt, daß die durch tubuläre Sekretion in den Primärharn gelangenden organischen Säuren bzw. Basen um einen gemeinsamen Transportmechanismus konkurrieren und sich gegenseitig kompetitiv hemmen. Die antagonistische Wirkung ist dabei von der Affinität der Verbindungen zum Transportsystem abhängig. In unseren Stop-Flow-Experimenten waren die PAH-/Inulin-Clearancequotienten, die als Maß für die proximale Sekretion der Para-Aminohippursäure dienen können, erheblich größer, wenn die Tiere kein Demethylchlortetracyclin erhielten. Das spricht dafür, daß Demethylchlortetracyclin die tubuläre Sekretion der Para-Aminohippursäure reduziert. Dieses Ergebnis kann somit als indirekter Hinweis für die Existenz der tubulären Sekretion des Demethylchlortetracyclins gewertet werden. (Siehe Abbildung 12).

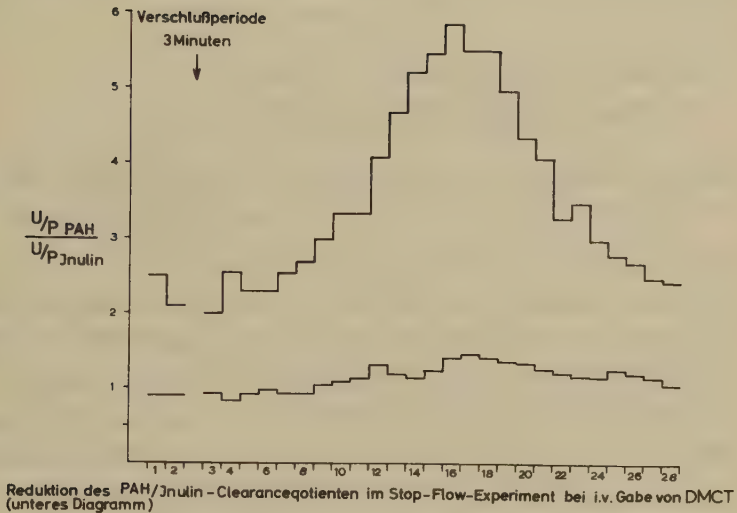


Abbildung 12

4. Bestimmung der Antibiotika-Clearance
bei gleichzeitiger Gabe von Probenecid.

Verschiedene pharmakologische und klinische Untersuchungen haben übereinstimmend gezeigt, daß Probenecid die tubuläre Sekretion verschiedener organischer Säuren hemmen kann. Am bekanntesten ist seine Anwendung zur Erhöhung der Penicillinkonzentration bei lang anhaltender antibiotischer Behandlung. Die Reduktion einer Pharmakon-Clearance unter dem Einfluß des p-Carboxybenzol-sulfodipropylamid (Probenecid) erlaubt auch einen Rückschluß auf den Mechanismus der renalen Elimination des Arzneimittels. Sie zeigt nämlich, daß das Pharmakon tubulär sezerniert wird. Wir haben daher die renale Clearance

der beiden Tetracycline bei gleichzeitiger Gabe von Probenecid gemessen und die Werte mit den Daten bei Abwesenheit des Hemmstoffes verglichen.

a. Messung der Chlortetracyclin-Clearance

bei kontinuierlicher Gabe von Probenecid.

Die Experimente wurden mit der gleichen Technik durchgeführt, die wir bei den in Kapitel 1 und 2 beschriebenen Versuchen verwendet haben.

Unter der kontinuierlichen Infusion von Probenecid in einer Dosis von 20 mg/kg und Stunde war die glomeruläre Filtration der Tiere fast genau so groß wie bei den Kontrollen, die kein Probenecid erhielten. Die Clearance des Antibiotikums wurde durch das Probenecid nicht reduziert.

Von dem filtrierte Antibiotikum wurden bei den Kontrollen 66 % ausgeschieden. In Gegenwart des Hemmstoffes waren es nur 64 %. Die geringe Reduktion ließ sich aber nicht statistisch sichern. (Siehe Tabelle 2). Diese Resultate stimmen im Prinzip mit den bei der Stop-Flow-Analyse des Chlortetracyclins gewonnenen Ergebnissen überein.

b. Messung der Demethylchlortetracyclin-Clearance

bei kontinuierlicher Gabe von Probenecid.

Auch diese Resultate bestätigen die aus den Stop-Flow-Experimenten abgeleiteten Aussagen. Unter dem Einfluß des Probenecids wurde die Clearance des Demethylchlortetracyclins von 2,95 auf 2,24 ml/kg und Minute gesenkt. Von der filtrierte Antibiotikamenge wurden nur 23 % mit dem Harn eliminiert. Ohne Zufuhr von Probenecid erhöhte sich dieser Wert auf 33 %. Die Herabsetzung der Antibiotika-Clearance durch den tubulären Hemmstoff ist statistisch gesichert. Dieses spricht dafür, daß die tubuläre

	Konzentration im Plasma P	Ausscheidung im Urin U · V	$\frac{U \cdot V}{P_j}$	$\frac{U \cdot V}{P}$	$\frac{U \cdot V}{P}$ $\frac{U_j \cdot V}{P_j}$
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/kg} \cdot \text{Min}$	$\text{ml/kg} \cdot \text{Min}$	$\text{ml/kg} \cdot \text{Min}$	
CTC n = 10	5,74 $\pm 0,472$	30,48 $\pm 3,085$	8,09 $\pm 0,295$	5,31 $\pm 0,155$	0,66 $\pm 0,035$
CTC +Probenecid n = 12	8,31 $\pm 0,601$	48,45 $\pm 5,855$	9,09 $\pm 0,295$	5,83 $\pm 0,127$	0,64 $\pm 0,033$
P	< 0,01			< 0,4	< 0,4

Fehlen der Probenecidwirkung (CTC-Clearance)

Tabelle 2

	Konzentration im Plasma P	Ausscheidung im Urin U · V	$\frac{U \cdot V}{P_j}$	$\frac{U \cdot V}{P}$	$\frac{U \cdot V}{P}$ $\frac{U_j \cdot V}{P_j}$
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/kg} \cdot \text{Min}$	$\text{ml/kg} \cdot \text{Min}$	$\text{ml/kg} \cdot \text{Min}$	
DMCT n = 10	19,49 $\pm 1,791$	57,47 $\pm 13,410$	8,88 $\pm 0,220$	2,95 $\pm 0,123$	0,33 $\pm 0,022$
DMCT + Probenecid n = 12	31,99 $\pm 1,373$	71,68 $\pm 7,018$	9,57 $\pm 0,255$	2,24 $\pm 0,056$	0,23 $\pm 0,013$
P	< 0,0002			< 0,01	< 0,003

Erniedrigung der DMCT-Clearance durch Probenecid

Tabelle 3

Sekretion an der Elimination des Tetracyclins beteiligt ist. Hiermit wiederum stimmt überein, daß die Plasmakonzentration des Demethylchlortetracyclins durch das Probenecid im Vergleich zu den Kontrollen erhöht wird. (Siehe Tabelle 3).

5. Abfall der Plasmakonzentration nach einmaliger Injektion von 20 mg/kg Chlortetracyclin bzw. Demethylchlortetracyclin.

Die zwischen der renalen Clearance des Chlortetracyclins und des Demethylchlortetracyclins gefundenen Unterschiede wurden bei kontinuierlicher Zufuhr der Antibiotika und konstanter Plasmakonzentration während eines relativ kurzen Zeitabschnittes gemessen. Wenn die verminderte renale Clearance des Demethylchlortetracyclins für die Steigerung der Wirkungsintensität gegenüber dem Chlortetracyclin verantwortlich sein soll, so muß der Nachweis erbracht werden, daß die Plasmakonzentration nach Zufuhr von Demethylchlortetracyclin langsamer abfällt als nach Gabe des Chlortetracyclins. Wir haben dies mit Hilfe einer Anordnung geprüft, bei der die Tiere 20 mg/kg des Antibiotikums zu Beginn des Versuches in Form einer einmaligen Dosis erhielten. Hierdurch werden auch die Bedingungen besser imitiert, die bei der therapeutischen Anwendung der Antibiotika gegeben sind. Sie werden bekanntlich im allgemeinen nicht kontinuierlich sondern in Form von Einzeldosen verabfolgt, die nach Abfall der Plasmakonzentration wiederholt werden.

Die Versuche zeigen, daß die verminderte renale Clearance des Demethylchlortetracyclins tatsächlich für den langsameren Abfall der Plasmakonzentration mit verantwortlich ist. Nach Zufuhr des Chlortetracyclins und Einstellung eines Diffusionsgleichgewichtes erniedrigt sich die gegenüber der Zeit aufgetragene Plasmakonzentration entsprechend der Gleichung $y = 2,383 - 0,512x + 0,0320x^2$. Hieraus berechnet sich eine Eliminationskonstante von $K_2 = 0,2778$. Die biologische Halbwertszeit $t/2 = \frac{\ln 2}{K_2}$ beträgt 2,5 Stunden. (Siehe Abbildung 13).

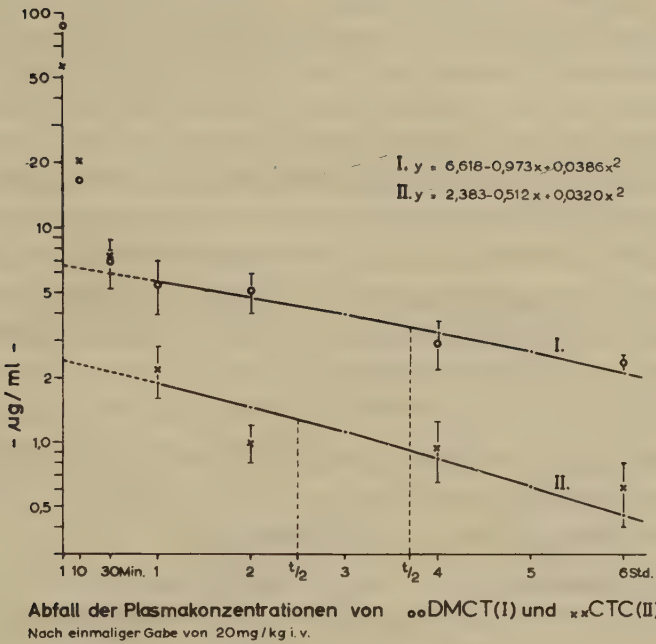


Abbildung 13

Mittlere Plasmakonzentration		$\frac{U \cdot V}{P}$	
CTC	DMCT	CTC	DMCT
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	ml/Tier · Min	ml/Tier · Min
1,42	4,44	1,17	0,74
n = 7	n = 6		

Vergleich der CTC- und der DMCT- Clearance
 (6 -ständiger Versuch)

Tabelle 4

Nach Applikation des Demethylchlortetracyclins fällt die Plasmakonzentration des Antibiotikums langsamer ab. Die Erniedrigung der Plasmakonzentration (y) erfolgt, gegenüber der Zeit (x) aufgetragen, entsprechend der Funktion $y = 6,618 - 0,973 x + 0,0386 x^2$. (Siehe Abbildung 13). Die Eliminationskonstante (K_2) wird von 0,2778 (CTC) auf 0,1869 (DMCT) erniedrigt. Die Demethylierung des Chlortetracyclins verlängert somit die biologische Halbwertszeit von 2,5 (CTC) auf 3,7 (DMCT) Stunden, d.h. um 49%. (Siehe Tabelle 5).

Hierfür ist die Erniedrigung der renalen Clearance mit verantwortlich, die von 1,17 ml/Tier und Minute (CTC) auf 0,74 ml/Tier und Minute (DMCT) reduziert wird. (Siehe Tabelle 4).

6. Abfall der Plasmakonzentration und Clearance des Demethylchlortetracyclins nach einmaliger intravenöser Injektion von 20 mg/kg und kontinuierlicher Zufuhr von Probenecid.

Clearanceuntersuchungen bei konstanter Plasmakonzentration und kontinuierlicher Zufuhr von Demethylchlortetracyclin haben gezeigt, daß Probenecid die renale Clearance des Antibiotikums verringert. (Siehe Kapitel 4b). Es mußte jetzt noch der Nachweis erbracht werden, daß der Abfall der Plasmakonzentration des Antibiotikums unter dem Einfluß des tubulären Hemmstoffes verzögert wird. Wir verwendeten hierfür die gleiche Versuchsanordnung, die wir zur Messung der biologischen Halbwertszeiten und der Eliminationskonstanten der beiden Antibiotika benutzt haben, um ihre Wirkungsdauer miteinander zu vergleichen.

Unter der kontinuierlichen Zufuhr des Probenecids (20 mg/kg und Stunde i. v.) wurden während des gesamten Versuches höhere Konzentrationen im Plasma gemessen. Acht Stunden nach der Injektion betrug die Konzentration des Demethylchlortetracyclins noch 4,6 $\mu\text{g/ml}$ Plasma. Ohne Zufuhr des Hemmstoffes der tubulären Sekretion hatten wir zu dem gleichen Zeitpunkt eine Konzentration von nur 1,25 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. (Siehe Abbildung 14). Die Eliminationskonstante wurde von $K_2 = 0,1869$ (DMCT) auf

0,1268 erniedrigt, die biologische Halbwertszeit $t/2 = 3,7$ Stunden auf 5,5 Stunden verlängert. (Siehe Tabelle 5). Dies entspricht einer "Wirkungsverstärkung" von 47,8 %.

Probenecid verzögert den Abfall der Plasmakonzentration um den gleichen Prozentsatz, um den die Demethylierung die biologische Halbwertszeit im Vergleich zum Chlortetracyclin verlängert. Die Wirkungsverstärkung des Probenecids ist auch an den verschiedenen Eliminationskonstanten abzulesen. Der Hemmstoff der tubulären Sekretion erniedrigt die Eliminationskonstante des Demethylchlortetracyclins um 32 %. Um den gleichen Betrag wurde die Eliminationskonstante des Chlortetracyclins durch die chemische Veränderung des Moleküls, d.h. durch die Demethylierung reduziert. (Siehe Tab. 5).

	Halbwertszeit $t/2$		Eliminations- konstante K_2
CTC (I) n = 7	2,49	CTC (I)	0,2778
DMCT (II) n = 6	3,70	DMCT (II)	0,1869
DMCT +Probenecid (III) n = 7	5,47	DMCT +Probenecid (III)	0,1268
Verlängerung von $t/2$ durch Demethy- lierung (II - I)	1,21	Reduktion von K_2 durch Demethy- lierung (II - I)	0,0909
in %	48,6	in %	32,7
Verlängerung von $t/2$ durch Proben- ecid (III - II)	1,77	Reduktion von K_2 durch Probenecid (III - II)	0,0601
in %	47,8	in %	32,2

Verlängerung der biolog. Halbwertszeit durch Demethylierung sowie durch gleichzeitige Hemmung der tubul. Sekretion.

Tabelle 5

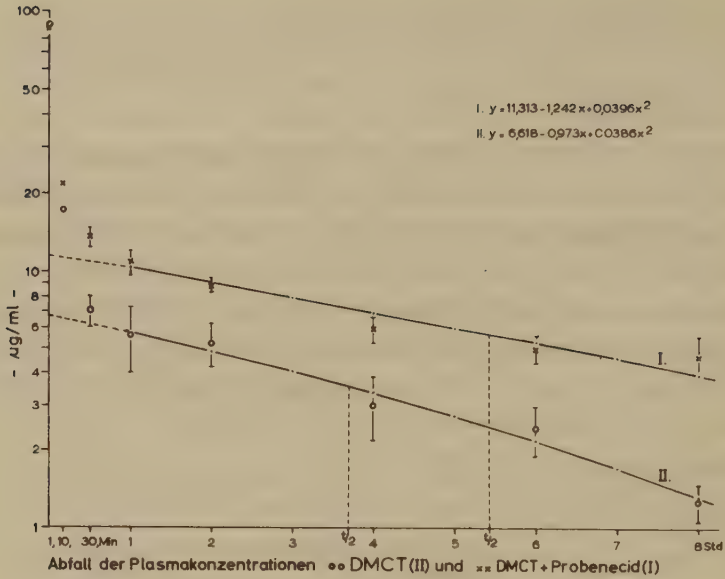


Abbildung 14

	U · V		p zwischen I + II	Mittlere Plasmakonzentration zwischen den einzelnen Sammelperioden		U · V P DMCT	U · V P DMCT + Probenecid
	I. DMCT n = 6	II. DMCT + Probenecid n = 7		DMCT	DMCT + Probenecid		
Std	µg/Tier	µg/Tier		µg/ml	µg/ml	ml/Tier · Min	ml/Tier · Min
0 - 1	444,6 ± 137,40	195,9 ± 28,08	< 0,2				
1 - 2	193,8 ± 34,44	106,6 ± 17,51	< 0,05	5,25	9,55	0,61	0,19
2 - 4	353,0 ± 47,45	141,1 ± 17,70	< 0,002	4,09	7,98	0,72	0,15
4 - 6	188,9 ± 41,00	134,7 ± 23,11	< 0,3	2,76	6,13	0,57	0,18
0 - 6	1179,4 ± 191,50	552,7 ± 57,55	< 0,01	4,44	8,44	0,74	0,18

Erniedrigung der DMCT-Ausscheidung und der DMCT- Clearance nach Gabe von Probenecid.

Tabelle 6

Bei diesen Versuchen haben wir auch die DMCT-Mengen bestimmt, die zwischen den einzelnen Blutentnahmen mit dem Harn eliminiert wurden. (Siehe Tabelle 6).

Probenecid reduzierte die Ausscheidung des Antibiotikums mit dem Harn in allen Sammelperioden. Während des sechsstündigen Versuches wurden $1180 \mu\text{g DMCT/Tier}$ im Urin ausgeschieden, wenn die Tiere kein Probenecid erhielten. Unter der kontinuierlichen Zufuhr des Derivates der Benzoesäure wird dieser Wert auf $553 \mu\text{g/Tier}$ und 6 Stunden erniedrigt. Die Differenz ist statistisch gesichert.

Die Verminderung der renalen Elimination des Antibiotikums zeigt sich auch an der Herabsetzung der DMCT-Clearance, die aus der Harnausscheidung und der mittleren Plasmakonzentration berechnet wurde. Sie betrug $0,74 \text{ ml/Tier und Minute}$, wenn die tubuläre Sekretion des Antibiotikums nicht gehemmt wurde.

Unter Zufuhr von Probenecid wurde die tubuläre Sekretion reduziert. Nur $0,18 \text{ ml Plasma/Tier und Minute}$ wurden von dem Antibiotikum befreit.

Die Ergebnisse zeigen, daß der verlangsamte Abfall der Plasmakonzentration des Antibiotikums mit einer Abnahme der Urinausscheidung und der Clearance des Antibiotikums einhergeht, wenn die tubuläre Sekretion des Demethylchlortetracyclins durch Probenecid gehemmt wird.

7. Reduktion der Demethylchlortetracyclin-Clearance beim Menschen.

Nach den Ergebnissen der tierexperimentellen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, daß Probenecid die tubuläre Sekretion des Demethylchlortetracyclins auch beim Menschen hemmen kann. Wir haben daher in einem orientierenden Versuch geprüft, ob das Derivat der Benzoesäure die Plasmakonzentration des Demethylchlortetracyclins erhöht und die

renale Clearance des Antibiotikums erniedrigt.

Drei Stunden nach Einnahme von 600 mg DMCT wurde eine Plasmakonzentration von $3,3 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Nach sechs Stunden erhöhte sich dieser Wert auf $3,6 \mu\text{g/ml}$ Plasma. 12 Stunden nach der Einnahme betrug die Plasmakonzentration $2,0 \mu\text{g/ml}$, nach 26 Stunden $0,1 \mu\text{g/ml}$.

Dieser Versuch wurde unter gleichen Bedingungen an derselben Versuchsperson wiederholt, mit dem Unterschied, daß außer den 600 mg DMCT dreimal 500 mg Probenecid im Abstand von 6 Stunden eingenommen wurden. Die Plasmakonzentration war hierbei gegenüber dem vorausgegangenen Versuch deutlich erhöht. Der 3 Stunden Wert wurde mit $6,3 \mu\text{g/ml}$ Plasma bestimmt. Danach fiel die Konzentration des Antibiotikums langsam ab. Neun Stunden nach der Einnahme des Antibiotikums betrug sie aber immer noch $5,1 \mu\text{g/ml}$. Nach 26 Stunden wurde ein Wert von $1,1 \mu\text{g/ml}$ Plasma gemessen, der somit mehr als zehnmal so hoch wie in dem Vorversuch war, in dem kein Probenecid eingenommen wurde.

Die renale Clearance, die aus den mittleren Plasmakonzentrationen während der dritten bis neunten Stunde des Versuches gemessen wurde, wurde durch das Probenecid von 112 auf 78 ml/1,73 m^2 Oberfläche erniedrigt. (Siehe Tabelle 7). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die tubuläre Sekretion des Demethylchlortetracyclins auch beim Menschen durch Probenecid gehemmt werden kann.

Versuchs- person: Dr. G. S.	DMCT Konzentrationen im Plasma µg/ml			$\frac{U \cdot V}{P}$ (DMCT) ml / 1,73m ² Oberfläche	
			nach Gabe von 1,5g Probenecid		nach Gabe von 1,5g Probenecid
37 Jahre 78 kg 180 cm					
Zeit in Stunden nach Einnahme von 600mg DMCT	3	3,65	6,25	112,0	78,5
	6	3,63	5,01		
	9	3,31	5,06		
	12	2,00	1,25		
	26	0,10	1,13		

Erhöhung der DMCT-Plasmakonzentration nach Gabe von Probenecid bei einer Versuchsperson.

Tabelle 7

8. Berechnung der "Verteilungsvolumina" von
Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin.

Bei der Auswertung der Clearance-Versuche fiel auf, daß die Plasmakonzentration des Demethylchlortetracyclins im Vergleich zu der des Chlortetracyclins stärker erhöht war, als bei der gemessenen Herabsetzung der DMCT-Clearance zu erwarten wäre. Diese Diskrepanz könnte ihre Ursache in einem geringeren Verteilungsvolumen des Demethylchlortetracyclins haben. Wir haben daher das "Verteilungsvolumen" der beiden Antibiotika aus den mit dem Harn ausgeschiedenen Mengen und den Plasmakonzentrationen der Antibiotika berechnet, die wir in den Infusionsversuchen bei einmaliger i.v. Injektion gemessen haben. (Siehe Kapitel 6). Es handelt sich dabei nur um Annäherungswerte, da die Stuhlausscheidung der Antibiotika nicht in die Bilanz mit einbezogen wurde.

Aus den Resultaten lassen sich dennoch zwei Aussagen ableiten: Beiden Antibiotika ist gemeinsam, daß ihre "Verteilungsvolumina" erheblich größer sind, als es dem Gesamtwassergehalt der Tiere entspricht. Eine Stunde nach intravenöser Injektion des Demethylchlortetracyclins wurde bereits ein Verteilungsvolumen gemessen, das mehr als dreimal so groß wie das Körpergewicht des Tieres war. In den folgenden Stunden stieg dieser Wert noch weiter kontinuierlich an. "Verteilungsvolumina", die das Körpergewicht überschreiten, wurden auch nach Gabe des Chlortetracyclins gemessen. (Siehe Abbildung 15). Dies spricht dafür, daß die beiden Tetracycline im intrazellulären Raum gegen einen Konzentrationsgradienten angereichert werden, und ein aktiver Transport nicht nur in der Niere in Form der tubulären Sekretion sondern auch in anderen Organen stattfindet.

Die zwischen beiden Antibiotika bestehenden Unterschiede zeigen sich auch in einem schnelleren Anstieg des "CTC - Verteilungsvolumens". Die größere "Verteilung" des Chlortetracyclins führt somit zu einer stärkeren Erniedrigung der Plasmakonzentration. Dieser Vorgang trägt neben der

erhöhten renalen Clearance dazu bei, den Abfall der Plasmakonzentration zu beschleunigen. Das größere "Verteilungsvolumen" des Chlortetracyclins spricht nicht unbedingt auch für eine größere intrazelluläre Akkumulation. Es könnte vielmehr auch durch einen Abbau und durch eine vermehrte Elimination mit dem Stuhl vorgetäuscht sein. (Siehe Diskussion).

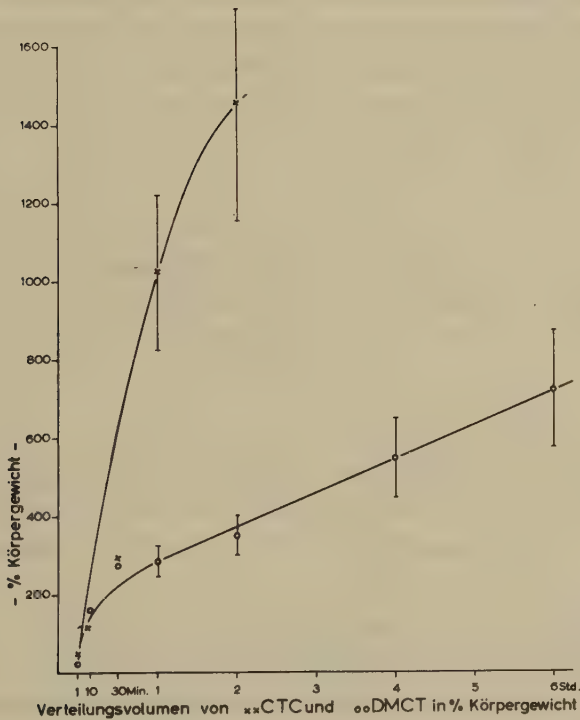


Abbildung 15

Einen weiteren Hinweis für einen aktiven Transport des Demethylchlortetracyclins in den intrazellulären Raum extrarenaler Gewebe erhielten wir auch bei der Berechnung der "Verteilungsvolumina", die von dem Demethylchlortetracyclin bei gleichzeitiger Zufuhr von Probenecid eingenommen wurden. Sie wurden nämlich durch Probenecid erniedrigt. (Siehe Abbildung 16). Dieses Resultat spricht dafür, daß der Hemmstoff den aktiven Transport des Antibiotikums nicht nur in der Niere, sondern auch in anderen Organen reduziert. Die nach Gabe des Probenecids auftretende Erhöhung der Plasmakonzentration wird somit durch die Erniedrigung der renalen Clearance und durch die Abnahme des Verteilungsvolumens bedingt. Dieser Vorgang trägt dazu bei, die Plasmakonzentration noch weiter zu erhöhen.

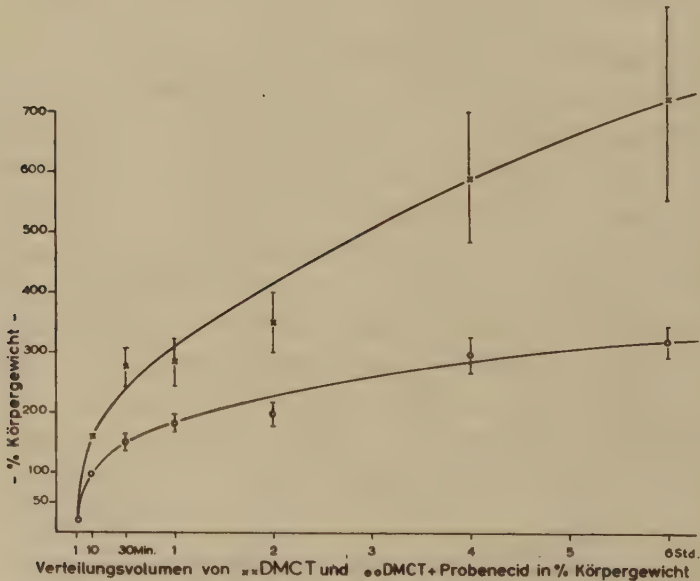


Abbildung 16

IV. Diskussion

Die Demethylchlortetracyclin-Konzentrationen im Plasma sind höher als die Chlortetracyclin-Konzentrationen, wenn beide Antibiotika in gleicher Dosis verabfolgt werden. Dies ist zu einem Teil durch die niedrigere renale Clearance des Demethylchlortetracyclins bedingt. Wir können zeigen, daß hierbei noch ein anderer Vorgang beteiligt ist. Chlortetracyclin nimmt scheinbar ein größeres "Verteilungsvolumen" ein. Dies beruht sehr wahrscheinlich im wesentlichen auf der Instabilität der Verbindung, wie von Paine (1948), Bohonos (1953), Mc. Cormick (1957) und Kunin und Finland (1958) festgestellt wurde. Hinzu kommt, daß eine Erniedrigung der Plasmakonzentration auch noch durch eine größere Elimination des Chlortetracyclins mit dem Stuhl verursacht werden kann, die nicht in die Bilanz mit einbezogen wurde. Ein Vergleich der von Dornbusch (1950) und Welch (1950) für das Chlortetracyclin mit den von Garrod und Waterworth (1959/60) für das Demethylchlortetracyclin mitgeteilten Werte zeigt nämlich, daß die Ausscheidung des Chlortetracyclins mit dem Stuhl mehr als doppelt so hoch wie die des Demethylchlortetracyclins ist.

Die verminderte Elimination des Demethylchlortetracyclins im Stuhl beruht aber nicht auf einer Erniedrigung der Ausscheidung des demethylierten Tetracyclins mit der Galle, wie von Kunin und Finland (1959) festgestellt wurde. Da in der Gallenflüssigkeit sogar noch höhere DMCT- als CTC-Konzentrationen gefunden werden (Hall (1954), Kunin, Finland (1959)), muß die verminderte Stuhlausscheidung des Demethylchlortetracyclins auf einer erhöhten enteralen Resorption beruhen. Die zwischen dem enterohepatischen Kreislauf der beiden Antibiotika bestehenden Unterschiede ähneln somit weitgehend den Differenzen, die wir bei der Messung der renalen Clearance festgestellt haben; vom Demethylchlortetracyclin wird ein größerer Anteil tubulär resorbiert und auf diese Weise der renalen Ausscheidung entzogen.

Bisher war man der Ansicht, daß die Tetracycline ausschließlich auf dem Wege über die glomeruläre Filtration (Kunin, Dornbusch und Finland 1959) in den Primärharn gelangen und von dort wieder ein Teil in das peritubuläre Blut zurückdiffundiert. Eine zusätzliche tubuläre Sekretion wurde nicht in Erwägung gezogen, da die aus der Antibiotika- und der Inulin-clearance gebildeten Quotienten unter 1 liegende Werte aufweisen. Die Stop-Flow-Analysen haben aber gezeigt, daß die Messung der Clearance keinen Rückschluß auf eine tubuläre Sekretion zuläßt. Sie kann vorhanden sein, obwohl die Clearancequotienten unter 1 liegende Werte aufweisen.

Die Rückdiffusion des Demethylchlortetracyclins ist so groß, daß eine tubuläre Sekretion in der Gesamtbilanz nicht mehr in Erscheinung tritt. Die Existenz einer tubulären Sekretion des Demethylchlortetracyclins konnte nicht nur durch die Resultate der Stop-Flow-Analysen gestützt werden. Einen weiteren Hinweis erhielten wir aus Untersuchungen, in denen die Clearance des Antibiotikums durch Probenecid reduziert wird. Probenecid gehört neben dem Phenolrot, dem Bromkresolgrün und anderen Sulphthaleinen zu den Verbindungen, welche die tubuläre Sekretion der in der Niere ausgeschiedenen organischen Säuren hemmen. (Weiner, Washington und Mudge 1960, Braun 1962 (siehe dort weitere Literatur)). Sehr wahrscheinlich ist dies ein Ausdruck einer Kompetition um einen für den Transport erforderlichen Rezeptor. Aus der Reduktion der DMCT-Clearance durch das Probenecid läßt sich nun wiederum auf die tubuläre Sekretion des Demethylchlortetracyclins schließen.

Der kompetitive Antagonismus zwischen den verschiedenen tubulär sezernierten Substanzen macht es verständlich, daß die Clearancequotienten der Para-Aminohippursäure in unseren Stop-Flow-Experimenten bei Anwesenheit des Demethylchlortetracyclins niedriger waren, da auch diese organische Säure nicht nur filtriert sondern auch tubulär sezerniert wird. Wir müssen natürlich noch untersuchen, ob die PAH-Clearance nur unter den experimentellen Bedingungen der Stop-Flow-Analyse reduziert

wird. Sollte die Sekretion der Para-Aminohippursäure auch unter dem Einfluß therapeutischer DMCT-Dosen erniedrigt werden, so wäre dieser Befund vor allem für die Klinik von Bedeutung. Die Messung der Nierendurchblutung mit Hilfe der PAH-Clearance ergäbe nämlich dann einen Wert, der der tatsächlichen Nierendurchblutung nicht entsprechen würde.

Probenecid hat anscheinend nicht nur eine renale Wirkung. Die Abnahme der "Verteilungsvolumina" des Demethylchlortetracyclins während der kontinuierlichen Zufuhr des Probenecids deutet darauf hin, daß die Akkumulation des Tetracyclins auch in anderen Organen gehemmt wird. Der extrarenale Angriff des Probenecids könnte in der Leber vermutet werden, wobei die Anreicherung des Tetracyclins in der Gallenflüssigkeit vermindert würde. Auf jeden Fall sind die in der Gallenflüssigkeit auftretenden DMCT-Konzentrationen erheblich höher als im Plasma. (Kunin und Finland 1959). Dies spricht für einen aktiven Transport des Pharmakons in die Leberzellen.

Einen Hinweis für eine tubuläre Sekretion des Chlortetracyclins konnten wir im Stop-Flow-Experiment nicht erhalten. Hiermit läßt sich vereinbaren, daß Probenecid keine statistisch gesicherte Reduktion der Chlortetracyclineclearance bewirkt. Dieses Resultat stimmt im Prinzip mit den bereits von Altemeier (1951) mitgeteilten Befunden überein, nach denen Probenecid die Ausscheidung des Chlortetracyclins beim Menschen nicht reduziert.

Die Ausscheidung der Tetracycline wird durch die glomerulär filtrierte Menge der Antibiotika und im entscheidenden Maße durch die Rückdiffusion der Pharmaka bestimmt. Der zurückdiffundierende Anteil ist beim Demethylchlortetracyclin größer als beim Chlortetracyclin, wie aus der Messung der renalen Clearance beider Substanzen hervorgeht. Dieser Vorgang wird im Falle des Demethylchlortetracyclins durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Moleküls und in gewissem Umfang auch durch die tubuläre Sekretion begünstigt. Hierdurch kann nämlich der Gradient zwischen den Konzentrationen des Demethylchlortetracyclins im

tubulären Harn und im peritubulären Blut so steil werden, daß die anschließende Rückdiffusion des Demethylchlortetracyclins im Vergleich zum Chlortetracyclin noch weiter verstärkt wird.

Es zeigt sich somit wieder eine prinzipielle Übereinstimmung zwischen den Mechanismen der renalen und der enteralen Elimination des Pharmakons. Obwohl die Ausscheidung des Demethylchlortetracyclins mit der Galle - dieser Vorgang kann mit der tubulären Sekretion verglichen werden - größer ist als beim Chlortetracyclin, wird mit dem Stuhl weniger ausgeschieden. Dies kann nur mit einer stärkeren Rückdiffusion bzw. enteralen Resorption erklärt werden.

V. Zusammenfassung

Die Clearance der Antibiotika Chlortetracyclin und Demethylchlortetracyclin sowie der Mechanismus ihrer renalen Elimination wurde bei Ratten unter standardisierten Bedingungen untersucht.

Die Clearance des Demethylchlortetracyclins betrug 2,95, die des Chlortetracyclins 5,31 ml/kg Tier und Minute.

Die aus der Clearance der Antibiotika und der Clearance des Inulins berechneten Quotienten zeigen, daß 33 % des glomerulär filtrierte Demethylchlortetracyclins mit dem Harn ausgeschieden werden. Beim Chlortetracyclin sind es 66 %.

Die im Vergleich zum Chlortetracyclin erniedrigte Demethylchlortetracyclineclearance ist eine der wesentlichen Ursachen für den langsameren Abfall der DMCT-Konzentration im Plasma. Die niedrigere CTC-Plasmakonzentration wird außerdem noch durch die Instabilität der Verbindung und die größere Ausscheidung mit dem Stuhl bedingt.

Stop-Flow-Analysen weisen darauf hin, daß Demethylchlortetracyclin nicht nur glomerulär filtriert sondern auch tubulär sezerniert wird.

Probenecid hemmt die tubuläre Sekretion und die renale Elimination des Demethylchlortetracyclins. Die Clearance des Antibiotikums wird hierdurch reduziert, der Abfall der Plasmakonzentration verzögert.

Die Berechnung der Eliminationskonstanten und der biologischen Halbwertszeiten zeigen, daß der Probenecideffekt ungefähr genau so groß ist wie der durch Demethylierung des Chlortetracyclins bedingte.

Probenecid hat anscheinend auch noch eine extrarenale Wirkung, die in einer Abnahme des "DMCT-Verteilungsvolumens" zum Ausdruck kommt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Verminderung des aktiven Transportes in der Leber, die zu einer Reduktion der DMCT-Ausscheidung mit der Galle führt.

VI. Literaturverzeichnis

- ALTEMEIER, W.A.: J.Omaha Mid.-West. Clin.Soc.3 (1951)
Zitiert nach Walter, A.M. Heilmeyer, L.:
Antibiotika-Fiebel. G.Thieme Verlag,
Stuttgart.
- BEYER, K.H., Benemid, p-(di-n-propylsulfamyl)-
RUSSO, H.F. benzoic acid:
TILLSON, E.K. Its renal affinity and its elimination.
MILLER, A.K. Am.J.Physiol. 166 : 625 (1951).
VERWEY, W.F.,
GRASS, S.R.:
- BLISS, E.A., Studies of Terramycin in vivo and in
WARTH, P.T., vitro. Bull.Johns Hopk.Hosp.
CHANDLER, C.A., 87 : 171 (1950).
LONG, P.H.:
- BOHONOS, N., In vitro studies with chlortetracycline,
DORNBUSCH, A.C., oxytetracycline and tetracycline.
FELDMANN, L.I. Antibiot. Ann. 49 (1953-54).
MARTIN, J.H.,
PELCAK, E. and
WILLIAMS, J.H.:
- BRAUN, W.: Zum Mechanismus der gegenseitigen
Hemmung von Phenolrot, p-Aminohippur-
säure und Probenecid. Naunyn-Schmiede-
bergs Arch.exper.Path.u.Pharmak.
239 : 400 (1960).
- BRAUN, W.: Habilitationsschrift: Untersuchungen über
den aktiven Transport organischer Säuren
und Basen in Nierenschnitten. Pharm.
Inst.d.Univ.Hamburg (1962).
- DORNBUSCH, A.C. zitiert nach METZGER, W.I. and SHAPSE,
J.B. Evaluation of oral Aureomycin for
intestinal antiseptis. J.Bact. 59: 309
(1950).
- DOST, F.H.: Der Blutspiegel. Georg Thieme Verlag,
Leipzig (1953).
- DUGGAR, B.M.: Aureomycin a product of the continuing
search for new antibiotics. Ann.N.Y.
Acad.Sci. 51 : 177 (1949).

- FRIEDMANN, S. M.,
POLLEY, J. R.,
FRIEDMANN, C. L.: The clearance of Inulin and Sodium-p-aminohippurate in the rat. Am. J. of Physiol. 150 : 340 (1947).
- FÜHR, J.,
KACZMARCZYK, J.,
KRÜTTGEN, C. D.: Eine einfache colorimetrische Methode zur Inulinbestimmung für Nierenclearance-untersuchungen bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. Klin. Wochenschrift 33 : 729 (1955).
- GARROD, L. P. and
WATERFORTH, P. M.: The relative merits of four tetracyclines. Antib. Ann. 1959/60 : 440.
- GILL, E.: Übersichten Demethylchlortetracyclin. Deut. Med. Wochenschr. 26 : 1353 (1962).
- GOLDBERG, H. S.: Antibiotics. Their chemistry and non-medical uses. D. Van Nostrand Company, Inc. (1959).
- HAJDU, P., HÄUSSLER, A.: Fluorimetrische Mikrobestimmungen von Pyrrolidino-methyl-tetracyclin im Serum. Arzneimittelforschung. 2 : 206 (1962).
- HALL, B.: The absorption and distribution of Aureomycin in man. Ann. of Int. Med. 40 : 743 (1954).
- HERKEN, H., SENFT, G.,
WILUTZKY: Die Erzeugung von Natrium- und Wasserretensionen zur Prüfung der Diuretica. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 229 : 123 (1956).
- HERKEN, H., SENFT, G.,
SCHWARZ, W.,
MERKER, H. J.: Struktur und Funktion der Glomerula nach Einwirkung von Glucocorticoiden bei der Aminonucleosidnephrose. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 245 : 289 (1963).
- KUNIN, C. M.,
DORNBUSCH, A. C.,
FINLAND, M.: Distribution and excretion of four tetracycline analogues in normal young men. J. clin. Invest. 38 : 1950 (1959).
- KUNIN, C. M. and
FINLAND, M.: Demethylchlortetracycline: A new tetracycline antibiotic that yields greater and more sustained antibacterial activity. New Engl. J. of Med. 259 : 999 (1958).
- KUNIN, C. M. and
FINLAND, M.: Exkretion of demethylchlortetracycline into the bile. New Engl. J. of Med. 261 : 1069 (1959).

- KOHN, K.W.: Determination of tetracyclines by extraction of fluorescent complexes. Application to biological materials. Anal.Chem. 33 : 862 (1961).
- KÜSTER, F.W. bearbeitet von THIEL, A.: Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker, Walter De Gruyter & Co. (1923).
- Mc.CORMICK, J.R.D., SJOLANDER, N.O., HIRSCH, U., JENSEN, E.R.; DOERSCHUK, A.P.: A new family of antibiotics: The demethyl-chlortetracyclines. J.Am.chem.Soc. 79 : 4561 (1957).
- MALVIN, R.L., SULLIVAN, L.P., WILDE, W.S.: Stop-flow analysis of renal tubular localisation. Physiologist 1 : 58 (1957).
- MALVIN, R.L. WILDE, W.S., SULLIVAN, L.P.: Localisation of nephron transport by stop-flow analysis. Am.J.of Physiol. 194 : 135 (1958).
- MAYRS, E.B., WATT, J.M.: Renal blood flow and glomerular filtration. J.of Physiol. 56:120 (1922).
- MOSHER, R.E., BOYLE, A.J., BIRD, E.J., JACOBSEN, S.D., BATCHELOR, T.M., ISERI, L.T. and MYERS, G.B.: The use of flame photometry for the quantitative determination of sodium and potassium in plasma and urine. Am.J.Clin.Path. 19 : 461 (1949).
- MUDGE, G.H.: Clinical patterns of tubular dysfunction. Am.J.Med. 24 : 785 (1958).
- NÖLLER, H.G.: Eine Technik der Blutentnahme bei kleinen Säugetieren. Pflügers Arch. ges. Physiol. 267 : 543 (1958).
- PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine Tafel). Biologisches Zentralblatt 63 : 154 (1943).
- PAINE, T.F.Jr., COLLINS, H.S., FINLAND, M.: Bacteriologic studies on Aureomycin. J.Bact. 56 : 489 (1948).
- ROBERTS, C.E., PERRY, D.M., KUCHARIC, H.A., KIRBY, W.M.M.: Demethylchlortetracycline and tetracycline. Arch.of Int.Med. 107 : 204 (1961).

- SCHOLTAN, W.,
SCHMID, J.: Die Bindung der Antibiotica an die Eiweißkörper des Serums. 2. Mitteilung: Eiweißbindung der Tetracycline. Arzneimittelforschung 4 : 288 (1963).
- SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Antibiotica an die Eiweißkörper des Serums. 3. Mitteilung: Theorie und Gesetzmäßigkeiten. Arzneimittelforschung 13 : 347 (1963).
- SPERBER, I.: Sekretion of organic anions in the formation of urine and bile. Pharmacol. Rev. 11 : 109 (1959).
- UDENFRIEND, S.: Fluorescent assay in biology and medicine. Molekular Biology 3 (1962).
- WEINER, I. M.,
WASHINGTON, J. A.,
MUDGE, G. H.: On the mechanism of action of probenecid on renal tubular secretion. Bull. Johns Hopk. Hosp. 106 : 333 (1960).
- WELCH, H.: Absorption, excretion and distribution of Terramycin. Ann. N. Y. Acad. Sc. 53 : 253 (1950).

Zum Abschluß möchte ich Herrn Professor Dr. med.
H. Herken und Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Senft
für die Überlassung des Themas und ihre Hilfe durch
Ratschläge und Diskussionen danken.

Ich danke auch Herrn Dr. med. G. Hollman für die
Anleitung bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 4. September 1938 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Kurt Borgmann und seiner Ehefrau, der Krankenschwester Ilse Borgmann geb. Weidemann in Berlin geboren. Ich bin in Lindow/Mark und Lauenburg/Elbe aufgewachsen. In beiden Orten besuchte ich die Grundschule. 1949 kam ich nach Berlin zurück und besuchte hier den neusprachlichen Zweig der I. OWZ Schadow-Schule zu Berlin Zehlendorf. Im Frühjahr 1959 legte ich die Reifeprüfung ab und begann anschließend an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Zahnheilkunde.

Am 14. November 1961 bestand ich das Physikum für Zahnmediziner. Im Juli 1963 begann ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin, Leiter Herr Professor Dr. med. H. Herken, unter der Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Senft mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation. Das zahnmedizinische Staatsexamen habe ich am 4. August 1964 an der Freien Universität Berlin bestanden.

